

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

09/856840

8818 Rec'd PCT/PTO 2 5 MAY 2001

932.1199

**UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

Re: Application of: David REVERTER, et al.  
Serial No.: Not yet known  
Filed: Herewith  
For: METALLOCARBOXYPEPTIDASE INHIBITOR  
AS FIBRINOLYTIC AGENT

**LETTER RE PRIORITY**

Assistant Commissioner for Patents  
Washington, DC 20231-9998

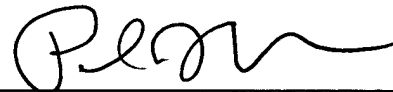
May 25, 2001

Dear Sir:

Applicant hereby claims the priority of Spanish Patent Application No. 9802524 filed November 25, 1998 through International Patent Application No. PCT/ES99/00378 filed November 24, 1999.

Respectfully submitted,

By:



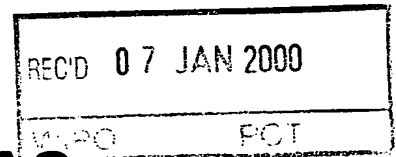
Paul J. Higgins  
Reg. No. 44,152

Steinberg & Raskin, P.C.  
1140 Avenue of the Americas, 15th Floor  
New York, NY 10036-5803  
Telephone: (212) 768-3800  
Facsimile: (212) 382-2124  
E-mail: sr@steinberggraskin.com

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

4  
ES99/378**OFICINA ESPAÑOLA**

de

**PATENTES y MARCAS****CERTIFICADO OFICIAL**

Por la presente certifico que los documentos adjuntos son copia exacta de la solicitud de PATENTE de INVENCION número 9802524, presentada en este Organismo, con fecha 25 de Noviembre de 1998.

Madrid, 27 de diciembre de 1999

El Director del Departamento de Patentes  
e Información Tecnológica.

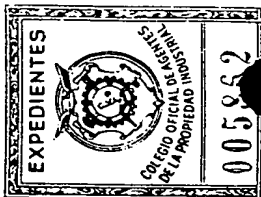
P.D.

M. MADRUGA

**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

OFICINA DE SOLICITUD DE:

☒ PATENTE DE INVENCION ☐ MODELO DE UTILIDAD

(1)	(2) EXPED. PRINCIPAL O DE ORIGEN
<input type="checkbox"/> SOLICITUD DE ADICION	MODALIDAD .....
<input type="checkbox"/> SOLICITUD DIVISIONAL	NUMERO SOLICITUD .....
<input type="checkbox"/> CAMBIO DE MODALIDAD	FECHA SOLICITUD .....
<input type="checkbox"/> TRANSFORMACION SOLICITUD EUROPEA	MODALIDAD .....
	NUMERO SOLICITUD .....
	FECHA SOLICITUD .....

NUMERO DE SOLICITUD **P9802524**

GENERALITAT DE CATALUNYA  
DEPARTAMENT D'INDUSTRIA  
ECONOMIA I COMERCIO O.E.P.M.

FECHA Y HORA DE PRESENTACION EN LUGAR DISTINTO O.E.P.M.  
**25 NOV. 1998**

CIDEM  
Provença, 339 - 08037-Barcelona

(4) SOLICITANTE(S)	APELLIDOS O DENOMINACION JURIDICA	NOMBRE	DNI
	UNIVERSITAT AUTONOMA DE BARCELONA y LUDWIG MAXIMILIANS UNIVERSITÄT MÜNCHEN		

(5) DATOS DEL PRIMER SOLICITANTE

DOMICILIO .....

LOCALIDAD **BELLATERRA**

PROVINCIA **BARCELONA**

PAIS RESIDENCIA **ESPAÑA**

NACIONALIDAD **ESPAÑOLA**

TELEFONO [.....]

CODIGO POSTAL **[08193]**

CODIGO PAIS **[ES]**

CODIGO NACION **[ES]**

(6) INVENTOR(ES)

(7) ☐ EL SOLICITANTE ES EL INVENTOR

☒ EL SOLICITANTE NO ES EL INVENTOR O UNICO INVENTOR

(8) MODO DE OBTENCION DEL DERECHO

☒ INVENC. LABORAL ☐ CONTRATO ☐ SUCESION

APELLIDOS	NOMBRE	NACIONALIDAD	COD. NACION
REVERTER	David	ESPAÑOLA	ES
VENDRELL	Josep	ESPAÑOLA	ES

(9) TITULO DE LA INVENCION

**INHIBIDOR DE METALOCARBOXIPEPTIDASAS COMO AGENTE FIBRINOLITICO.**

(10) INVENCION REFERENTE A PROCEDIMIENTO MICROBIOLOGICO SEGUN ART. 25.2 L.P. ☐ SI ☐ NO

(11) EXPOSICIONES OFICIALES

LUGAR .....

FECHA .....

(12) DECLARACIONES DE PRIORIDAD

PAIS DE ORIGEN	COD. PAIS	NUMERO	FECHA

(13) EL SOLICITANTE SE ACOGE A LA EXENCION DE PAGO DE TASAS PREVISTA EN EL ART. 162 L.P. ☐ SI ☐ NO

(14) REPRESENTANTE

APELLIDOS **PONTI SALES**

NOMBRE **Adelaida**

CODIGO **[3883]**

DOMICILIO **Consell de Cent, 322**

LOCALIDAD **BARCELONA**

PROVINCIA **BARCELONA**

COD. POSTAL **[08007]**

(15) RELACION DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN

☒ DESCRIPCION. N.º DE PAGINAS... **14**

☒ REIVINDICACIONES. N.º DE PAGINAS... **2**

☐ DIBUJOS. N.º DE PAGINAS...

☒ RESUMEN

☐ DOCUMENTO DE PRIORIDAD

☐ TRADUCCION DEL DOCUMENTO DE PRIORIDAD

☐ DOCUMENTO DE REPRESENTACION

☐ PRUEBAS

☐ JUSTIFICANTE DEL PAGO DE TASAS

☒ HOJA DE INFORMACIONES COMPLEMENTARIAS

☒ OTROS soporte magnético

☒ disquete secuencias declar de in. SI

(16) NOTIFICACION DE PAGO DE LA TASA DE CONCESION

Se le notifica que esta solicitud se considerará retirada si no procede al pago de la tasa de concesión; para el pago de esta tasa dispone de tres meses a contar desde la publicación del anuncio de la concesión en el BOP. más los diez días que establece el art. 81 del R.D. 10-10-86.

FIRMA DEL FUNCIONARIO

FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE



OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

20202524

NUMERO	SOLICITUD
GENERALITAT DE CATALUNYA	
DEPARTAMENT D'INDUSTRIA, COMERCIO I TURISME	
FECHA	25 NOV. 1998

HOJA INFORMACIONES COMPLEMENTARIAS

CIDEM  
Provença, 339 - 08037-Barcelona

- ☒ PATENTE DE INVENCION  
☐ MODELO DE UTILIDAD

(4) SOLICITANTES	APELLIDOS O RAZON SOCIAL	NOMBRE	DNI

(6) INVENTORES	APELLIDOS	NOMBRE	NAC.
CANALS HORTSMANN QUEROL FRITZ SOMMERHOFF AVILES		Francesc Jeanny Enrique Hans Christian P. Francesc X.	ES DE ES DE DE ES

(11) EXPOSICIONES OFICIALES	
LUGAR:	FECHA:

(12) DECLARACIONES DE PRIORIDAD			
PAIS DE ORIGEN	CODIGO	NUMERO	FECHA





# PATENTE

## RESUMEN Y GRAFICO

NÚMERO DE SOLICITUD

**P 9 8 0 2 5 2 4**

FECHA DE PRESENTACION

**25 NOVIEMBRE 1998**

RESUMEN (Máx. 150 palabras)

### INHIBIDOR DE METALOCARBOXIPEPTIDASAS COMO AGENTE FIBRINOLITICO

La invención trata del gen de un inhibidor de metalocarboxipeptidasas de la sanguijuela *Hirudo medicinalis*, secuencia del mismo y de la proteína por él codificada, de la caracterización de la misma. La invención también se refiere a su aplicación farmacológica como agente fibrinolítico.

GRAFICO



(31) NUMERO

DATOS DE PRIORIDAD

(32) FECHA

(33) PAIS

A1

(12) PATENTE DE INVENCION

(21) NUMERO DE SOLICITUD

P9802524

(22) FECHA DE PRESENTACION  
25.11.98

(71) SOLICITANTE(S)

UNIVERSITAT AUTONOMA DE BARCELONA  
LUDWIG MAXIMILIANS UNIVERSITÄT MÜNCHEN

DOMICILIO

NACIONALIDAD  
ESPAÑOLA  
ALEMANA

08193 BELLATERRA (Barcelona) y 80336 Munich (Alemania), Nussbaumstrasse 20

(72) INVENTOR(ES)

David Reverter, Josep Vendrell, Francesc Canals, Jeanny Horstmann, Enrique Querol, Hans Fritz, Christian P. Sommerhoff, y Francesc X. Avilés

(73) TITULAR(ES)

(11) N.º DE PUBLICACION

(45) FECHA DE PUBLICACION

(62) PATENTE DE LA QUE ES  
DIVISIONARIA

GRAFICO (SOLO PARA INTERPRETAR RESUMEN)

(51) Int. Cl.

(54) TITULO

INHIBIDOR DE METALOCARBOXIPEPTIDASAS  
COMO AGENTE FIBRINOLITICO.

(57) RESUMEN (APORTACION VOLUNTARIA, SIN VALOR JURIDICO)

INHIBIDOR DE METALOCARBOXIPEPTIDASAS  
COMO AGENTE FIBRINOLITICO

La invención trata del gen de un inhibidor de metalocarboxipeptidasas de la sanguijuela *Hirudo medicinalis*, secuencia del mismo y de la proteína por él codificada, de la caracterización de la misma. La invención también se refiere a su aplicación farmacológica como agente fibrinolítico.

**INHIBIDOR DE METALOCARBOXIPEPTIDASAS  
COMO AGENTE FIBRINOLITICO**

**5 CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a inhibidores de metalocarboxipeptidasas como agentes fibrinolíticos. En particular, la presente invención se refiere a la  
10 identificación, clonación y determinación de la secuencia del gen y de la proteína por él codificada y a la aplicación de las propiedades fibrinolíticas de uno de ellos procedente de la sanguijuela *Hirudo medicinalis*, el LCI (de Leech Carboxypeptidase Inhibitor).

15

**1.- ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

Las proteasas y sus inhibidores participan en numerosos procesos biológicos (Fritz, H., Schmidt, I., and  
20 Turk, V. (eds.) (1990) Special volume on Proteinase Inhibitors and Biological Control Biol. Chem. Hoppe-Seyler, Vol. 371; Avilés, F.X. (ed.) (1993) Innovations in Proteases and their Inhibitors, Walter de Gruyter, Berlin.), entre los cuales está el de la coagulación y la  
25 fibrinólisis, constituyendo la subfamilia de las metalocarboxipeptidasas un importante grupo dentro de ellas (Hooper NM (ed.) (1996) Zinc Metalloproteases in Health and Disease, Taylor and Francis Ltd., London). Al contrario que en el caso de los inhibidores de  
30 endopeptidasas, tan sólo se han identificado unos pocos inhibidores de metalocarboxipeptidasas (Avilés et al. (1993) Eur. J. Biochem. 211, 381-389; Hass & Ryan (1981) Methods Enzymol. 80, 778-791; Homandberg et al. (1989) Arch. Biochem. Biophys. 270, 153-161; Normant et al.  
35 (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 12225-12229). Los

inhibidores de Solanacea y de Ascaris inhiben las carboxipeptidasas a través de su región C-terminal que interacciona con el enzima como un sustrato. Por el contrario, el inhibidor procedente del cerebro de rata  
 5 inhibiría a través de una región que presenta similitud de secuencia con el bucle inhibidor de las regiones "pro" de estas enzimas, o sea posicionando el bucle inhibidor sobre el centro activo del enzima (Coll et al. (1991) EMBO J., 10, 1-9; Guasch et al. (1992) J. Mol. Biol., 224, 141-57;  
 10 García-Saez et al. (1997) EMBO J. 16, 6906-6913).

Se han aislado diversos inhibidores proteicos de proteasas a partir de sanguijuelas (Ascenzi et al. (1995) Molec. Aspects Med. 16, 215-313). Entre los mismos los hay que actúan como anticoagulantes, por ejemplo las hirudinas  
 15 específicas de trombina y la antistatina específica del factor Xa (Tuszynsky et al. (1987) J. Biol. Chem. 262, 9718-9723). Es un hecho destacable que la sanguijuela parece contener inhibidores contra todas las proteasas de los mastocitos humanos (triptasa, quimasa, cathepsina G y  
 20 metalocarboxipeptidasa A). Los mastocitos al ser activados en los procesos infectivos liberan enzimas que contribuyen a iniciar el sistema de defensa del huésped. Los inhibidores que produce la sanguijuela podrían tener como función el bloqueo del mencionado sistema de defensa del  
 25 huésped [Huntley et al. (1990) Parasite Immunol. 12, 85-95; Douch et al. (1996) Int. J. Parasitol. 26, 91-95; Miller, H.R. (1996) Vet. Immunol. Immunopathol. 54, 331-336; Arizono et al. (1996) Clin. Exp. Immunol. 106, 55-61].

30 Se describe a continuación la secuencia del gen, de la proteína en él codificada y algunas características de un nuevo inhibidor de metalocarboxipeptidasas obtenido de sanguijuela, el primero descrito para este organismo, que se ha denominado LCI (de Leech Carboxypeptidase  
 35 Inhibitor). También se describe su producción recombinante

y ensayos de actividad biológica. El LCI presenta muy poca similitud de secuencia con otros inhibidores de carboxipeptidasas descritos previamente. El LCI participaría en la eliminación de coágulos sanguíneos a través de la inhibición de la carboxipeptidasa B (o metalocarboxipeptidasa B) de plasma sanguíneo, también denominada TAFI, enzima que ha sido recientemente involucrado en el retardo de la fibrinólisis (Bajzar et al. (1995) J. Biol. Chem. 270, 14477-14484; Sakharov et al. (1997) J. Biol. Chem. 272, 14477-14482).

## 2.- COMPENDIO DE LA INVENCION

Es un objetivo de la presente invención la identificación de un inhibidor de metalocarboxipeptidasas, el LCI (de Leech Carboxypeptidase Inhibitor), de la sanguijuela *Hirudo medicinalis*.

Es otro objetivo de la presente invención la determinación de la secuencia del gen y de la proteína por él codificada, y la caracterización de la misma como una molécula con alta actividad inhibidora de metalocarboxipeptidasas.

Es todavía otro objetivo de la invención la utilización del inhibidor de metalocarboxipeptidasas de acuerdo con secuencia ID N° 2, aislada o en combinación con otros agentes fibrinolíticos a los que complementa o potencia, para la preparación de un medicamento útil como agente fibrinolítico.

La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende, como agente activo, una cantidad efectiva de dicho inhibidor de metalocarboxipeptidasas, o de derivados, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Finalmente, es objetivo de la presente invención la caracterización de la actividad fibrinolítica del

inhibidor de metalocarboxipeptidasas, el LCI, como principal objetivo terapéutico y aplicado del mismo.

### 3. DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

5

Los objetivos de la presente invención están relacionados con la identificación, la clonación y determinación de la secuencia del gen y de la proteína por él codificada, y con sus propiedades fibrinolíticas, de un  
10 inhibidor de metalocarboxipeptidasa procedente de la sanguijuela *Hirudo medicinalis*, el LCI (de Leech Carboxypeptidase Inhibitor).

En la forma de realización preferida de la presente invención los objetivos propuestos se han alcanzado  
15 mediante un proceso que incluye los objetivos parciales que se describen a continuación.

En primer lugar se ha aislado e identificado una actividad inhibidora de metalocarboxipeptidasas en extractos de la sanguijuela *Hirudo medicinalis* (LCI de  
20 Leech Carboxypeptidase Inhibitor). Asimismo se ha establecido un procedimiento de purificación del LCI, nativo y recombinante, y unos procedimientos de caracterización del mismo.

En una forma de realización adicional de la presente  
25 invención se ha obtenido una secuencia peptídica del fragmento N-terminal del inhibidor LCI nativo obtenido y purificado a partir del extracto de la sanguijuela *Hirudo medicinalis*. La información obtenida a partir de esta secuencia ha sido clave para el diseño de diversos  
30 oligonucleótidos que han permitido la posterior clonación del gen del LCI.

En otra forma de realización de la presente invención se ha preparado una genoteca de expresión de cDNA que, juntamente con los oligonucleótidos anteriormente  
35 mencionados, han permitido diseñar una estrategia de PCR-

RACE mediante la que se ha logrado la clonación del gen del LCI. Consecuencia directa de esta forma de realización ha sido la determinación de la secuencia nucleotídica del mencionado gen y de la proteína por él codificada.

5 En otra forma adicional de realización de la presente invención se han diseñado sistemas de expresión heteróloga de LCI recombinante (rLCI), sólo o en forma de proteína de fusión. Asimismo se han diseñado los correspondientes protocolos de separación proteolítica del rLCI de la  
10 proteína de fusión y los procedimientos de purificación y caracterización del rLCI.

En otra forma de realización de la presente invención se ha determinado la actividad fibrinolítica del LCI, actividad relacionada con su acción inhibidora de  
15 metalocarboxipeptidasas. La utilidad terapéutica del LCI se basa en la mencionada actividad fibrinolítica del mismo.

A continuación se describe un ejemplo que ilustra el modo preferente de desarrollo de la presente invención, el  
20 cual no pretende abarcar todas las posibilidades de diseño y aplicación de la presente invención.

#### 4.- EJEMPLO DEL MODO PREFERIDO DE REALIZACION DE LA INVENCION

25 Los objetivos de la presente invención se han alcanzado con la identificación, la determinación de la secuencia del gen y de la proteína por él codificada, y de sus propiedades fibrinolíticas, de un inhibidor de  
30 metalocarboxipeptidasas procedente de la sanguijuela *Hirudo medicinalis*, el LCI (de Leech Carboxypeptidase Inhibitor).

#### 4.A. Aislamiento, purificación, determinación de la masa y secuenciación del LCI.

Se purificó LCI a partir de extracto de sanguijuela *Hirudo medicinalis* (GEN Therapeutica, Bad Zwischenahn). Se disolvieron 0,5 g de extracto en tampón Tris/acetato 20 mM (pH 8,0). Se centrifugó a 13.000 x g durante 10 min y tras equilibrar el pH se cargó el sobrenadante en una columna de intercambio aniónico preparativa (TSK-DEAE 5PW, 2,5 x 15 cm; Toyo-Soda) conectada a un sistema de FPLC (Pharmacia). Se eluyó mediante un gradiente lineal (0% a 100%) de acetato amónico 0,8 M, tamponado con Tris/acetato 20 mM (pH 8,0). El flujo fue de 4 ml/min durante 80 min. Las fracciones se recogieron y se determinaron las actividades inhibitoras de las metalocarboxipeptidasas CPA1, CPA2 y CPB pancreáticas. La actividad inhibitora del LCI sobre dichas metalocarboxipeptidasas, así como sobre la carboxipeptidasa B (o metalocarboxipeptidasa B) plasmática, la más relevante para esta invención, así como y las correspondientes  $K_i$  fueron determinadas de acuerdo con ensayos previamente descritos (Burgos et al. (1989) J. Chromatog., 481, 233-243; Molina et al. (1992) Gene 116, 129-138 y (1994) J. Biol. Chem. 269, 21467-21472). Las  $K_i$  resultantes fueron de ~0,4 nM, a pH 7,5. Las fracciones que presentaban actividad inhibitora (fracciones 64min y 69 min) fueron liofilizadas y cromatografiadas por HPLC de fase reversa (columna Vydac C4) con un gradiente lineal (20% a 42%) de acetonitrilo en ácido trifluoroacético 0,1%, a un flujo de 1 ml/min durante 60 min. La actividad inhibitora de metalocarboxipeptidasas eluyó a los tiempos de retención de 38 y 34 min. La pureza del inhibidor se determinó mediante electroforesis de SDS-tricina (Schägger & Von Jagow (1986) Anal. Biochem. 166, 369-376). La masa molecular se determinó mediante espectroscopia de masas MALDI-TOF (BRUKER). Se realizó también la secuenciación de



residuos N-terminales e internos mediante degradación automática de Edman. La secuencia de los mencionados 28 residuos corresponde con la del apartado "Listado de secuencias".

5

#### 4.B. Clonación y secuenciación del cDNA del LCI.

A partir de la secuencia peptídica N-terminal y de un fragmento interno del LCI se diseñaron oligonucleótidos degenerados que permitieron una amplificación de cDNA por RACE-PCR (Fritz et al. (1991) Nucleic Acids Res. 19, 3747-3753; Frohman et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 8998-9002; Chenchik et al. (1996) BioTechniques 21, 526-534). Los oligonucleótidos, sintetizados por MWG-Biotech (Ebersberg, Germany), fueron los siguientes:

N1: 5'-GACGAATCNTTYTNTGYTAYCA-3' con N=A,C,G,T e Y=C,T (secuencia deducida a partir de los aminoácidos 5-12 del LCI)

N2: 5'-TGTGCTAYCARCCNGAYCARGT-3' con R=A,G (a partir de los aminoácidos 9-16)

N3: 5'-CCAGACCARGTNTGYTGYTTYAT-3' (a partir de los aminoácidos 13-20)

C1: 5'-CCTGTGSWRTANGGNACCCA-3' con S=G,C y W=A,T; (a partir de los aminoácidos 55-49)

25 YXT: 5'-CGAGGGGGATGGTCGACGGAAGCGACCT18-3', (modificado según Fritz et al. (1991) Nucleic Acids Res. 19, 3747-3753)

Y: 5'-CGAGGGGGATGGTCGACGG-3', (representa parte de YXT)

X: 5'-GATGGTCGACGGAAGCGACC-3', (representa parte de YXT)

30 El RNA total se aisló mediante el método del tiocianato de guanidinio (Chomczynski y Sacchi (1987) Anal. Biochem. 162, 156-159) a partir de sanguijuelas congeladas, y el mRNA poly(A)+ se purificó mediante afinidad por oligo (dT) (Farmacia). La primera hebra del  
35 cDNA se realizó utilizando como cebador el oligonucleótido

XYZ. En primer lugar se amplificó un fragmento interno del cDNA así como el 3' (3'-RACE). Para la primera fase del PCR se utilizaron los cebadores N1, N2 y N3 en todas las combinaciones con el cebador C1 o los cebadores X y Y. Se utilizó la polimerasa Goldstar polymerase (Eurogentec, Bélgica) mediante 30 ciclos de: a 94°C durante 20 sec, seguido de 1 min a 53°C y finalmente la extensión final a 72°C durante 2 min. Los productos del PCR se separaron por geles de electroforesis en agarosa 1,8%/Tris acetato. Los productos de la amplificación se eluyeron del gel y subclonados en el sistema pGEM-T AT-de (Promega) y utilizados posteriormente para transformar la cepa JM109 de E.coli. El extremo 5' del cDNA se obtuvo mediante el Marathon cDNA amplification kit de Clontech, USA. Para ello se utilizó el cebador adaptador AP1 de Marathon y los cebadores específicos del gen 5'-TAGTCAAGAAGAGAAATGCCCT-3' y 5'-TTAGCCTCGCATCAGTGACACACG-3' (complementarios a los nucleótidos 361-340 y 300-277 del cDNA (ver el apartado Listado de secuencias). La secuenciación de las diferentes secuencias parciales amplificadas permitió diseñar nuevos cebadores para 5'-RACE. Finalmente se obtuvo la secuencia del cDNA del LCI, consistiendo en un ORF de 243 pb, además de dos regiones no traducidas, una de 21 pb situada en posición 5' respecto al ORF y otra de 182 pb situada en 3' del mismo (ver el apartado Listado de secuencias). La traducción del ORF genera una secuencia de 81 aminoácidos, conteniendo un péptido señal de 15 residuos, lo que implica una secuencia del LCI maduro de 66 aminoácidos (ver el apartado Listado de secuencias). Una búsqueda en los bancos de datos de secuencias mostró que ninguna secuencia similar al LCI había sido descrita previamente.

#### 4.C. Expresión heteróloga del LCI.

La expresión heteróloga del LCI se realizó mediante

los vectores pIN-III-OmpA3 (Ghrayeb et al. (1984) EMBO J. 3, 2437-2442; Molina et al. (1992) Gene 116,129-138; Molina et al. (1994) J. Biol. Chem. 269, 21467-21472) y pET-32b (Promega). El vector pIN-III-OmpA3 fue digerido con EcoRI, los extremos digeridos con nucleasa Mung bean y digeridos con BamH1. Al vector linearizado resultante se le ligó el producto de lo obtenido (descrito en el apartado anterior) generándose el plásmido pIN-III-OmpA3-LCI y se transformó en la cepa MC1061 de E. coli. De forma similar, el vector pET-32b se digirió con EcoRV y BamH1 y se le ligó el producto de lo obtenido (descrito en el apartado anterior) generándose el plásmido pET-32b-LCI y se transformó en la cepa ADA494 de E. coli.

Para la obtención del LCI recombinante (a partir de ahora rLCI) como inóculo se utilizaron 5 ml de MC1061/pIN-III-OmpA3-LCI que se incubaron durante la noche a 37°C en M9CAS (conteniendo 0,3% de glicerol) y se utilizaron para inocular 5 l del mismo medio. Después de 2 h se añadió IPTG, a una concentración final de 0,5 mM. 24 h tras la inducción se centrifugó el cultivo a 10.000 x g durante 20 min y el sobrenadante se pasó a través de un cartucho Sep-Pak Plus C18 (Waters, Millipore). El material retenido en la columna se eluyó con 40 ml de 2-propanol al 30% y se concentró con un roto-vapor para eliminar el disolvente orgánico. A continuación se purificó el rLCI tal y como se ha descrito en el apartado 4.A. El rLCI se encontraba en el medio de cultivo. La cuantificación se realizó determinando la actividad inhibidora de metalocarboxipeptidasas.

En el caso del plásmido ADA494/pET-32b-LCI, el procedimiento fue el siguiente. Como inóculo se utilizaron 5 ml de ADA494/pET-32b-LCI, que se incubaron durante la noche a 37°C en medio LB y que se utilizaron para inocular 1 l del mismo medio. Cuando la densidad óptica del cultivo alcanzó valores de 0,4-0,6, se añadió IPTG, a una

concentración final de 0,4 mM. Tres horas después se purificó el rLCI (intracelular y como proteína de fusión a tioredoxina) utilizando una columna de  $\text{Ni}^{2+}$  (Pharmacia). La proteína de fusión se eluyó mediante imidazol 1 M, NaCl 0,5 M, Tris/HCl 20 mM, pH 7,9. Posteriormente se separó el rLCI de la proteína de fusión mediante digestión por enteroquinasa (Sigma) y purificó tal y como se ha descrito en el apartado 4.A. La cuantificación se realizó determinando la actividad inhibidora de metalocarboxipeptidasas.

En ambos casos se optimizó la expresión. En el caso del sistema pIN-III-OmpA3 el rendimiento más elevado se encontró utilizando glicerol 0,3% y IPTG 0,5 mM, de acuerdo con resultados previos en sistemas semejantes (Molina et al. (1992) Gene 116,129-138). El rendimiento, cultivado en frasco, fue de 3,4 mg/l de sobrenadante, con una recuperación del 60%. El rLCI se purificó según lo descrito en el apartado 4.A., y como control del procesamiento correcto por parte de la célula huésped se realizó una secuenciación del extremo N-terminal y una determinación de la masa molecular mediante espectroscopia de masas MALDI-TOF. En el caso del sistema pET-32b se obtuvieron 20-40 mg/l de la fusión tioredoxina-rLCI. Tras la digestión mediante enteroquinasa se obtenían 7 mg/l con una recuperación del 50%.

#### 4.D. Ensayo de actividad fibrinolítica del LCI.

El LCI promueve la degradación de los coágulos de fibrina por inhibición de la carboxipeptidasa B (o metalocarboxipeptidasa B) plasmática o TAFI (la constante de inhibición es  $\sim 0,4\text{nM}$ ). Ello es congruente con el hecho demostrado de que este último enzima inhibe la fibrinólisis al destruir los sitios de fijación del plasminógeno a la fibrina (Sakharov et al. (1997) J. Biol.

Chem. 272, 14477-14482). El ensayo se realizó con los componentes purificados de la fibrinólisis. La coagulación inicial (promovida por trombina) y la subsiguiente fibrinólisis (inducida por el activador del plasminógeno) se monitorizó a lo largo del tiempo por el aumento o disminución de la turbidez en un ensayo espectrofotométrico a 405 nm (Bajzar et al. (1996) J. Biol. Chem. 271,16603-16608). Diferentes concentraciones de carboxipeptidasa B (o metalocarboxipeptidasa B) plasmática, previamente activada a partir de su zimógeno por un mezcla de trombina (20 nM)-trombomodulina (50 nM), se ensayaron frente a concentraciones crecientes de LCI en un tampón HEPES 0,02 M, NaCl 0,15 M, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, Tween80 0,01%, pH 7,4. El medio de fibrinólisis consistía en fibrinógeno (3,36 mM), Glu plasminógeno (0,89 mM),  $\alpha$ 2-antiplasmina (0,56 mM) y antitrombina III (1,11 nM). Esta mezcla se mezcló con las diferentes concentraciones preparadas previamente de mezclas de carboxipeptidasa B (o metalocarboxipeptidasa B) plasmática-LCI y se ensayó en pocillos de una microplaca que contenía trombina (6,0 nM) y activador de plasminógeno (441pM). Se siguió la turbidez, a 405 nm, de las muestras de cada pocillo de la placa con medidas cada 2,5 min, a 37°C, y se midió el tiempo medio de lisis del coágulo. En las muestras que no contenían LCI el tiempo necesario para la lisis del coágulo era mucho mayor (no llegando nunca a más de un 5% de lisis en 30 horas). En cambio, en presencia de LCI, la carboxipeptidasa B (o metalocarboxipeptidasa B) plasmática resultó inhibida y por lo tanto la turbidez del medio desaparece más rápidamente. La destrucción del coágulo resultó mucho más rápida (la lisis ya era del 75% en 1,5 horas, alcanzándose el 100% en menos de 3 horas).

## 4. E. Lista de secuencias.

## INFORMACIÓN GENERAL

## (i) SOLICITANTE

- 5 (A) NOMBRE: UNIVERSITAT AUTÓNOMA DE BARCELONA  
 (B) CALLE: Campus UNIVERSITARI  
 (C) CIUDAD: BELLATERRA  
 (D) PROVINCIA: BARCELONA  
 (E) PAÍS: ESPAÑA  
 10 (F) CÓDIGO POSTAL (CD):08193  
 (G) TELEFONO: 93-581-16 36
- (A) NOMBRE: LUDWIG MAXIMILIANS UNIVERSITÄT MÜNCHEN  
 (B) CALLE: 20 NUSSBAUMSTRASSE  
 15 (C) CIUDAD: MÜNCHEN  
 (D) PAÍS: ALEMANIA  
 (E) CÓDIGO POSTAL (CD):D-80336
- (ii) TÍTULO DE LA INVENCION: INHIBIDOR DE METALOCARBOXIPEPTIDASAS COMO AGENTE FIBRINOLÍTICO
- 20 (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 2
- (iv) FORMATO PARA LECTURA POR ORDENADOR:
- (A) TIPO DE SOPORTE: Disco flexible  
 (B) ORDENADOR: IBM PC Compatible  
 (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS  
 25 (D) PROGRAMA: Patentin Release #1.0, Version #1.30 (EPO)

SEQ ID NO:1

LOCUS: cDNA lineal de doble hélice

DEFINICION: gen del inhibidor de metalocarboxipeptidasas  
 30 de Hirudo medicinalis

## CARACTERISTICAS:

Localización/Calificadores  
 /producto ="LCI"  
 /codon de inicio=22  
 /codón de parada= 265

35 ORIGEN DE LA MOLECULA: (a) Organismo:Hirudo medicinalis

COMPOSICION DE BASES      129 A      99 C      96 G      141 T

GACTTGGTAA CTCATTCGAT CATGTTTCTG CTCGTTTTCC TGTGCTGCCT 50

CCACCTGGTG ATTTTCGTCGC ATACACCAGA TGAGAGTTTC TTGTGCTACC 100

AACCAGACCA GGTGTGCTGT TTCATTTGCA GAGGAGCGGC ACCTTTGCCT 150

5 TCAGAAGGGG AATGCAATCC ACATCCTACA GCACCCTGGT GCCGGGAAGG 200

GGCTGTAGAG TGGGTTCCCT ACTCTACTGG TCAATGTTCGC ACAACCTGCA 250

TCCCATATGT CGAGTAGATG ACCCATCGTG TGTCACTGAT GCGAGGCTAA 300

CTCTCATTAT TTTCCTGAAC GCATCCTTGT TGAAATTTAA GGGCATTCT 350

CTTCTTGACT AATTATTTTG CTGAGTTAAA ATAATAAAAT AATATTGAAG 400

10 CATTATTTAA TAATGTTCTC GTTGAATAA AATATGATCG AAAGATAAAA 450

AAAAAAGAAA AAAAA

465

SEQ ID NO:2

1 gacttggtaactcattcgatc 21

15 22 ATG TTT CTG CTC GTT TTC CTG TGC TGC CTC CAC CTG GTG 60

-15 M F L L V F L C C L H L V -3

61 ATT TCG TCG CAT ACA CCA GAT GAG AGT TTC TTG TGC TAC 99

-2 I S S H T P D E S F L C Y 11

20 100 CAA CCA GAC CAG GTG TGC TGT TTC ATT TGC AGA GGA GCG 138

12 Q P D Q V C C F I C R G A 24

139 GCA CCT TTG CCT TCA GAA GGG GAA TGC AAT CCA CAT CCT 177

25 25 A P L P S E G E C N P H P 37

178 ACA GCA CCC TGG TGC CGG GAA GGG GCT GTA GAG TGG GTT 216

38 T A P W C R E G A V E W V 50

30 217 CCC TAC TCT ACT GGT CAA TGT CGC ACA ACC TGC ATC CCA 255

51 P Y S T G Q C R T T C I P 63

256 TAT GTC GAG tagatgacccatcgtgtgtcactgatgagaggctaactc 303

64 Y V E \* 66

35 304 tcattatTTTTcctgaacgcacatccttgttgaaatttaagggcatttctcttc 354

355 ttgactaattatTTTTgctgagttaaaataataaaataatattgaagcatta 405

406 ttttaataatgttctcgttttgaataaaatatgatcgaaagataaaaaaaaaa 456

457 gaaaaaaaaa 465

## R E I V I N D I C A C I O N E S

1. Secuencia nucleotídica recombinante que codifica  
5 para una secuencia de proteína que corresponde a un  
inhibidor de metalocarboxipeptidasas de *Hirudo  
medicinalis*.
2. Secuencia nucleotídica según la reivindicación 1,  
caracterizado por el hecho de que comprende la secuencia  
10 identificada como SEQ ID N° 1 del listado de secuencias.
3. Secuencia polipeptídica codificada en la secuencia  
nucleotídica según las reivindicaciones 1 y 2,  
caracterizada por el hecho de que comprende la secuencia  
identificada como SEQ ID N° 2 del listado de secuencias.
- 15 4. Secuencia polipeptídica de acuerdo con la  
reivindicación 3, donde dicha secuencia es sustancialmente  
homóloga a la secuencia identificada como SEQ N°2.
5. Secuencia nucleotídica que comprende una secuencia  
codificante de un polipéptido sustancialmente homólogo a  
20 la secuencia ID N° 2, según la reivindicación 3.
6. Vector de expresión procariota o eucariota  
caracterizado por el hecho de que incluye la secuencia  
nucleotídica recombinante según cualquiera de las  
reivindicaciones 1, 2 ó 5, y por el hecho de que es capaz  
25 de expresar el inhibidor de metalocarboxipeptidasas  
biológicamente activo.
7. Célula de *Escherichia coli* transformada  
caracterizada por el hecho de que comprende un vector de  
expresión según la reivindicación 6 y por el hecho de que  
30 es capaz de producir el inhibidor de  
metalocarboxipeptidasas biológicamente activo.
8. Procedimiento para preparar el inhibidor de  
metalocarboxipeptidasas recombinante según cualquiera de  
las reivindicaciones 3 a 4, caracterizado por el hecho de  
35 que comprende



(i) el cultivo del transformante que contiene un vector de expresión capaz de expresar un inhibidor de metalocarboxipeptidasas biológicamente activo; y

(ii) la obtención y purificación del mismo.

9. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8 caracterizado por el hecho de que el proceso recombinante se lleva a cabo en un huésped procariota o eucariota.

10 10. Inhibidor de metalocarboxipeptidasas de acuerdo con las reivindicaciones 3 ó 4, como agente fibrinolítico.

11. Utilización del inhibidor de metalocarboxipeptidasas de acuerdo con las reivindicaciones 3 ó 4, para la preparación de un  
15 medicamento útil como agente fibrinolítico.

12. Utilización del inhibidor de metalocarboxipeptidasas según la reivindicación 11, en combinación con otros agentes fibrinolíticos a los que complementa o potencia para la preparación de un  
20 medicamento útil como agente fibrinolítico.

13. Composición farmacéutica que comprende, como agente activo, una cantidad efectiva del inhibidor de metalocarboxipeptidasas, o de derivados, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, y un  
25 excipiente farmacéuticamente aceptable.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**